

[8] Albanell J., et al., 1996, *Cancer Res.*, **56**:1503-1508.

[9] Avilion A. A., et al., 1996, *Cancer Res.*, **56**:645-650.

EXPRESSION OF TELOMERASE RNA AND TELOMERASE ACTIVITY IN CANCER CELL LINES OF HUMAN REPRODUCTIVE TRACT

ZHENG Wei SHI Yi Fu WANG Sheng Qi

(Women's hospital, Zhejiang Medical University, Hang Zhou, 310006)

ABSTRACT

We used RT nested PCR and PCR-based TRAP method to determine the human telomerase RNA (hTR) and telomerase activity of five cancer cell lines of human reproductive tract. The result shown that hTR is strongly expressed in the five cancer cell lines of cervical cancer, choriocarcinoma and ovarian cancer. hTR is weakly expressed in normal ovarian tissue, cervical tissue and term placenta tissue. It has shown that telomerase activity was presented in the five cancer cell lines of human reproductive tract, and was also detected though at low levels, in normal ovarian tissue, whereas it was undetectable normal cervical tissue and term placenta tissue. Our findings suggest that RT nested PCR is a simple and effective method with high sensitivity. The expression of hTR gene and telomerase activity associated with proliferation of cancer cells of human reproductive tract may be useful tumor markers.

Key words: Telomerase RNA Polymerase chain reaction Reproductive tract Cancer Cell line

COUP-TE 和 RAR β 受体的表达影响癌细胞对视黄酸的敏感性*

吴 乔 张晓坤**

(厦门大学肿瘤细胞工程国家专业实验室 361005)

视黄酸 (retinoic acid, RA) 能够抑制许多类型癌细胞的恶性生长, 它的作用主要由于其受体 RARs (retinoic acid receptors) 和 RXRs (retinoid X receptors) 介导^[1], 这些受体作为配体激活的转录因子, 通过结合到视黄酸应答元件 (retinoic acid response element, RARE) 上调节基因的转录表达。RARs 和 RXRs 由 3 种不同基因: α 、 β 和 γ 编码, 通过各自的表达而使各自的功能。例如, 在许多类型的癌细胞中, RA 通过诱导其受体 RAR β 的表达而抑制癌细胞的生长^[2], 但在另一些癌细胞中, 这种抑制作用则丧失, 表明 RAR β 的表达是抑制癌细胞生

长的必要因子, 但不是唯一的因子, 提示可能还有其它受体参与调节癌细胞对 RA 的应答过程。本文研究表明, COUP-TF (chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor) 可能是这类受体中的一种受体。

COUP-TF 是一种孤生受体 (orphan receptor), 属于核受体超家族成员, 由两种不同的基因编码^[3]。COUP-TF 的特异性配体至今

* 福建省自然科学基金 (C 96002) 部分资助。

** 美国, 加州, La Jolla 癌症研究中心, Burnham 研究所。

未知,对其性质、功能也了解甚少。文献报道,COUP-TF 在胚胎发育过程中,对器官形成、神经发生和细胞分化等起着重要的作用^[4]。近来研究表明,COUP-TF 是抑制因子,它能够结合到许多激素应答元件上,而这些应答元件也可以被 RAR 和 RXR 等受体所识别,结果 COUP-TF 对这些受体的转录活性产生拮抗作用,竞争性地抑制这些受体与激素应答元件的结合^[5],由此提示,COUP-TF 可能参与调节 RA 的应答。本文研究则表明,COUP-TF 和 RAR β 受体的表达可能调节癌细胞对 RA 的敏感性。

材料与方 法

1. 细胞培养

细胞在含有 10%胎牛血清的培养液中生长。其中,肺癌细胞:Calu-6 细胞用 MEM 培养液;H292 细胞用 RPMI-1640 培养液。乳腺癌细胞:ZR-75-1 细胞用 RPMI-1640 培养液;MDA-MB-231 细胞用 DMEM 培养液。细胞来自 ATCC。

2. 细胞生长抑制测定

以 1000 细胞/孔的数量将细胞接种于 96 孔培养板,24 hr 后加入不同浓度的全反式视黄酸(all-trans RA, t-RA)处理细胞,8 天后以 MTT 染色法^[6]测定细胞生长率。

3. RNA 制备和 Northern blot

以 10^{-6} mol/L 的 t-RA 处理细胞。参照文献^[7]方法提取总 RNA,并进行 Northern blot。各种 DNA 探针以 α -³²P-dATP 和 α -³²P-dCTP 标记。为确定 RNA 总量,同一张膜用 β -actin DNA 探针杂交。

4. 细胞转染与稳定表达

克隆 COUP-TF 的表达载体(pRc/CMV)用磷酸钙沉淀法^[7]转染到 MDA-MB-231 细胞,G 418 抗生素筛选细胞,以 Northern blot 确定 COUP-TF 基因的表达。

5. DNA 瞬时转染和氯霉素乙酰转移酶(CAT)测定

参照文献^[7,8]方法。含有 β RARE 结构的报告基因与胸腺嘧啶脱氧核苷激酶启动子联结(β RARE-tk-CAT),一起与 COUP-TF 受体质粒(pRc/CMV)和 β -半乳糖苷酶表达载体(pCH 110,Pharmacia)等瞬时转

染到细胞, 10^{-7} mol/L 的 t-RA 处理细胞后,测定 β -半乳糖苷酶活性和 CAT 活性。

6. 凝胶阻滞测定

参照文献^[8]方法。 10^{-6} mol/L 的 t-RA 处理细胞后提取核蛋白。以 α -³²P-dATP 和 α -³²P-dCTP 标记 β RARE 寡核苷酸(AGGGTTCAGGCAAATTCAC)制备探针。先将抗 COUP-TF 抗体(1 μ l)与核蛋白(5 μ l)室温孵育 30 min,再与探针杂交 20 min,电泳,干胶,-80 $^{\circ}$ C 曝光,显影。

结 果

1. RAR β 和 COUP-TF 在癌细胞中的表达

Northern blot 显示,在肺癌细胞中,Calu-6 细胞不表达 RAR β ,但经 t-RA 的诱导后,RAR β 表达;同时,COUP-TF 在 Calu-6 细胞中表达。然而,在 H 292 细胞,尽管 RAR β 表达,但其表达水平与 t-RA 的诱导无关;同时,COUP-TF 在 H 292 细胞中不表达(图版图 1)。

在乳腺癌 ZR-75-1 和 MDA-MB-231 细胞中,RAR β 均不表达,但经 t-RA 的诱导后,在 ZR-75-1 细胞中 RAR β 表达,而在 MDA-MB-231 细胞中 RAR β 则不表达(图版图 2);同时,在 ZR-75-1 细胞中 COUP-TF 表达,而在 MDA-MB-231 细胞中,COUP-TF 则不表达(图版图 3)。

2. 视黄酸对癌细胞生长的影响

MTT 测定表明,在肺癌细胞中,t-RA 能够有效地抑制 Calu-6 细胞的生长,但不能抑制 H 292 细胞的生长(图 1)。在乳腺癌细胞中,t-

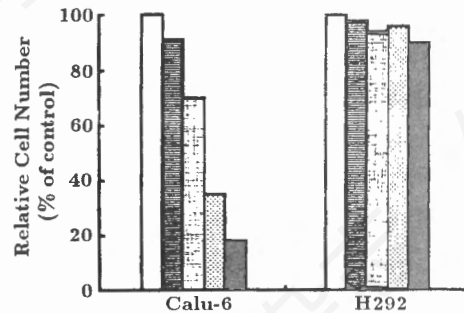


图 1 t-RA 对 Calu-6 和 H 292 细胞生长的抑制作用

RA 能够有效地抑制 ZR-75-1 细胞的生长,但不能抑制 MDA-MB-231 细胞的生长(图 2)。

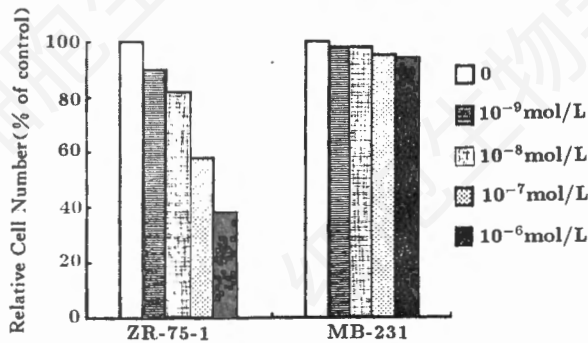


图 2 t-RA 对 ZR-75-1 和 MDA-MB-231 细胞生长的抑制作用

3. COUP-TF 基因转染对 H 292 细胞生长的影响

将 COUP-TF 基因转染不表达 COUP-TF 的 H 292 细胞,获得表达 COUP-TF 的 H 292 克隆细胞。对其中两株克隆细胞株(H 292/COUP-TFI-2 和 H 292/COUP-TFI-3)测定表明,在克隆细胞中,RAR β 不表达,但经 t-RA 的诱导后,RAR β 则高水平地表达(图版图 4)。MTT 测定表明,t-RA 不能抑制 H 292 细胞的生长,但能够有效地抑制克隆细胞的生长,生长抑制率高达 80%(图 3)。

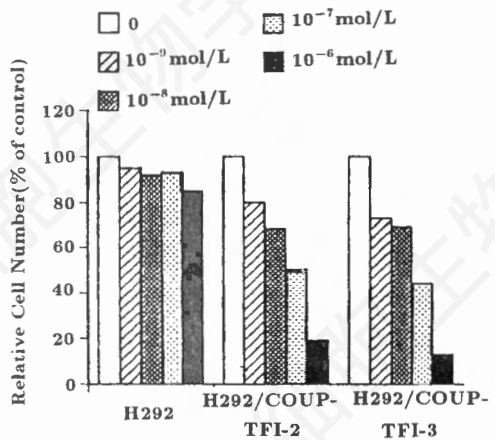


图 3 t-RA 对克隆细胞(H 292/COUP-TF) 细胞生长的影响

4. COUP-TF 基因对 H 292 细胞的视黄酸敏感性的影响

CAT 测定表明,将 COUP-TF 基因和报告基因 β RARE 一起,瞬时转染到 H 292 细胞时,随着 COUP-TF 浓度的增加,报告基因的基础转录活性显著下降(图 4:空心杆),但经 t-RA 的诱导后,报告基因的转录活性只轻微降低(图 4:实心杆)。

5. 视黄酸对 β RARE 转录活性的影响

CAT 测定显示,当报告基因 β RARE 转染到不同的癌细胞时,t-RA 对 β RARE 转录活性的影响不同:在 H 292 和 MDA-MB-231 细胞中,t-RA 几乎不能诱导 β RARE 的转录活性,但在 Calu-6 和 ZR-75-1 细胞中,t-RA 能够显著地诱导 β RARE 的转录活性(图 5)

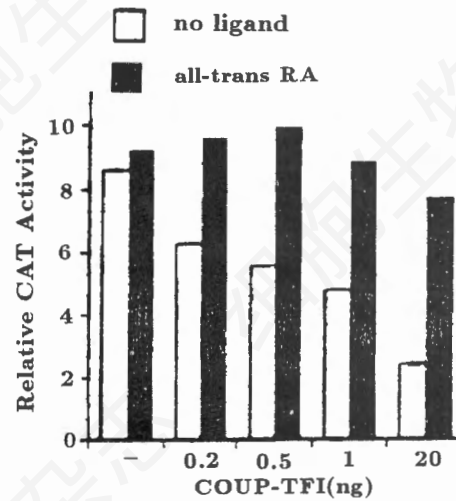


图 4 COUP-TF 基因转染的 CAT 测定

6. COUP-TF 复合物的形成

以 β RARE 为探针,通过凝胶阻滞测定显示,从 Calu-6 细胞中提取的核蛋白能够结合到 β RARE 上,形成很强的复合物(图版图 5,b),但从 H 292 细胞中提取的核蛋白则不能够结合到 β RARE 上,因此看不见复合物的形成(图版图 5,a)。进一步将 Calu-6 细胞的核蛋白与抗 COUP-TF 抗体共同孵育后,原来形成的复合物则向上移动(图版图 5,C),而单独加入抗

COUP-TF 抗体时,则没有复合物的形成(图版图 5,d),表明此复合物可能是 COUP-TF 蛋白或含有 COUP-TF 蛋白。

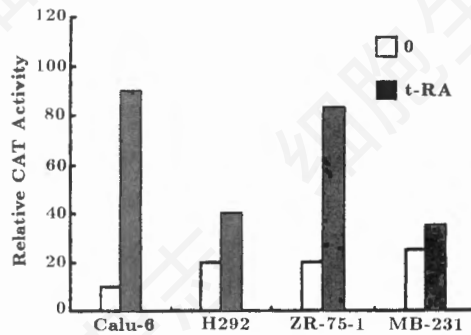


图 5 t-RA 对 β RARE 转录活性的影响

讨 论

视黄酸的作用主要由其受体 RARs 和 RXRs 介导,特别是 RAR β 受体在介导视黄酸对癌细胞生长的抑制中发挥着重要作用。实验表明,t-RA 通过诱导 Calu-6 和 ZR-75-1 细胞的 RAR β 表达(图版图 1,2),有效地抑制这两类细胞的生长(图 1,2)。但是,t-RA 不能诱导 MDA-MB-231 细胞的 RAR β 表达(图版图 2),对于 H 292 细胞,t-RA 的诱导则与 RAR β 的表达水平无关(图版图 1),由此导致 t-RA 对这两类细胞的生长丧失抑制作用(图 1,2),结果证实,RAR β 受体的表达可能是 RA 抑制癌细胞生长的重要因素之一。研究指出,RAR β 的表达是通过 RAR β 启动子上的 β RARE 来介导,RAR β 基因是 RA 的应答基因^[9]。CAT 测定表明,当报告基因 β RARE 转染不同的癌细胞时,t-RA 能够显著地诱导 Calu-6 和 ZR-75-1 细胞的 β RARE 的转录活性,但几乎不能诱导 H 292 和 MDA-MB-231 细胞的 β RARE 的转录活性(图 5),结果与 t-RA 诱导的 RAR β 表达结果相对应,表明 RAR β 受体在一些癌细胞中不表达可能是由于 β RARE 转录调节发生异常,导致 RA 不能激活 β RARE 的转录活性,所以,RA 对 RAR β 受体表达的诱导在扩增视黄酸应答

中起着关键的作用。许多证据表明,RAR β 功能的发挥与癌症的发展有关。在表皮肺癌中,RAR β 基因可作为肿瘤抑制因子,抑制某些癌基因形成肿瘤病灶^[10]。RAR β 还能够抑制肿瘤启动子 TPA 的作用,抑制原癌基因 c-Jun 和 c-Fos 的转录活性^[11]。由此提示,RAR β 活性的丧失意味着这种调控机制的丧失,从而导致癌细胞的恶性生长。

尽管 H 292 细胞中的 RAR β 表达(图版图 1),但 t-RA 却不能抑制细胞的生长(图 1),说明 RAR β 的表达还不能完全驱动癌细胞对 RA 的应答,提示除 RAR β 受体外,可能还有其它受体参与调节视黄酸的应答途径。实验表明,COUP-TF 可能是调节 RA 应答的又一受体。在 Calu-6 和 ZR-75-1 细胞中,COUP-TF 表达而在 H292 和 MDA-MB-231 细胞中,COUP-TF 不表达(图版图 1,2),结果与 RAR β 表达和细胞生长抑制结果相吻合,提示 COUP-TF、RAR β 和癌细胞生长之间存在着某种联系。为此,将 COUP-TF 基因转染到不表达此基因的 H 292 细胞中,在获得的其中两株克隆细胞中,RAR β 不表达,但经 t-RA 诱导后,不仅 RAR β 表达(图版图 4),而且克隆细胞的生长受到有效的抑制(图 3)。结果表明,COUP-TF 的表达既与 t-RA 诱导的 RAR β 表达有关,又能够恢复 RA 抗性细胞(如 H 292 细胞)对视黄酸的敏感性。所以,COUP-TF 和 RAR β 的表达能够加强癌细胞的 RA 敏感性。

COUP-TF 能够形成同源二聚体,抑制基础启动子的转录活性^[12],表明 COUP-TF 的作用并不是对基因的表达产生抑制,而是对靶基因的应答进行调控。CAT 测定显示,当 β RARE 报告基因和不同浓度的 COUP-TF 表达载体瞬时转染到 H 292 细胞后,COUP-TF 只能轻微地抑制 RA 诱导的 β RARE 转录活性,但 β RARE 的基础转录活性则被显著地抑制(图 4)。凝胶阻抑测定进一步证实,从 Calu-6 细胞中提取的核蛋白可能含有 COUP-TF 受体,它能够结合到 β RARE 上,形成很强的复合物(可

能是 COUP-TF 同源二聚体或 COUP-TF 和其它蛋白形成的异源二聚体), 因此当加入抗 COUP-TF 抗体后, 复合物(二聚体)的构型受破坏, 原来形成的复合物则向上移动(图版图 5)。由此表明, COUP-TF 可能通过结合到 β RARE 上, 来加强靶基因对 RA 应答的敏感性, 同时, COUP-TF 表达的水平可能提供调节靶基因敏感性的环境, 这种环境又可能被 t-RA 调控; 当 COUP-TF 不表达时, 细胞对 RA 产生抗性; 当 COUP-TF 表达时, 则能够抑制 RAR β 启动子上的 β RARE 的基础转录活性, 从而有利于 RAR β 的表达, 导致细胞的视黄酸敏感性增加。

摘 要

视黄酸(RA)通过其受体 RARs 和 RXRs 发挥作用。Northern blot 显示, RAR β 的表达介导 RA 对癌细胞的生长抑制作用。然而, 其它的结果表明, RAR β 的表达还不能完全驱动癌细胞对 RA 的应答, 由此提示, 癌细胞的 RA 敏感性除了受 RAR β 影响外, 还受其它因子影响。COUP-TF 则是其中的一个因子。凝胶阻滞测定和 CAT 测定表明, COUP-TF 通过降低 β RARE 的基础转录活性来加强癌细胞的 RA

敏感性。结果证实, RAR β 和 COUP-TF 受体的表达能够调节癌细胞对 RA 的敏感性。

关键词: COUP-TF RAR β 受体 视黄酸 癌细胞

参 考 文 献

- [1] Brand N. et al., 1988, *Nature*, **332**:850-853.
- [2] Yi L. et al., 1996, *Mol. Cell. Biol.*, **16**:1138-1149.
- [3] Wang L H. et al., 1989, *Nature*, **340**:163-166.
- [4] Pereira F. et al., 1995, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **53**:503-508.
- [5] Kliewer S A. et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**:1448-1452.
- [6] Mosmann T. 1983. *J. Immunol. Methods*, **65**:55-63.
- [7] 萨姆布鲁克等, 1993, 分子克隆实验指南(第二版), 科学出版社, 北京.
- [8] Lee M O. et al., 1995, *Mol. Cell. Biol.*, **15**:4194-4207.
- [9] De The H. et al., 1990, *Nature*, **343**:177-180.
- [10] Houle B. et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**:985-989.
- [11] Houle R. et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**:6092-6096.
- [12] Mangelsdorf D J. 1995, *Cell*, **83**:841-850.

THE EXPRESSION OF COUP-TF AND RAR β RECEPTORS AFFECT RA SENSITIVITY OF CANCER CELLS

WU Qiao ZHANG Xiao Kun

(The State Laboratory for Tumor Cell Engineering in Xiamen University)

ABSTRACT

Retinoic acid(RA) exerts its effect through its receptors, RARs and RXRs. It was showed by Northern blot that the expression of RAR β mediated the growth inhibitory effect by RA in cancer cells. However, other result showed that the expression of RAR β is not sufficient to render cancer cells responsive to RA. These observations suggest that RA sensitivity of cancer cells is also influenced by factors other than RAR β . One of the factors is COUP-TF receptor. Gel retardation assay and CAT assay indicated that COUP-TF could increase RA sensitivity of cancer cells by reducing basal transcriptional activity of β RARE. Taken together, our results demonstrate that the expressions of COUP-TF and RAR β modulate RA sensitivity of cancer cells.

Key words: COUP-TF RAR β Receptor Retinoic acid Cancer cell